[Dal R. Istituto di Studi Superiori in Firenze.
Laboratorio di Patologia Generale, diretto dal Prof. A. Lustig].

FENOMENO DI FISCHER (PROLIFERAZIONE EPITELIALE SPERIMENTALE NEL PADIGLIONE AURICOLARE DEL CONIGLIO) E BLASTOMICETI.

Dott. PIETRO RONDONI, aiuto e libero docente.

Estratto dallo Sperimentale (Archivio di Biologia normale e patologica)
Anno LXV - Fasc. V-VI — Settembre-Dicembre, 1911.

[Dal R. Istituto di Studi Superiori in Firenze.
Laboratorio di Patologia Generale, diretto dal Prof. A. Lustig].

FENOMENO DI FISCHER (PROLIFERAZIONE EPITELIALE SPERIMENTALE NEL PADIGLIONE AURICOLARE DEL CONIGLIO) E BLASTOMICETI.

Dott. PIETRO RONDONI, aiuto e libero docente.

Le esperienze di *Fischer* sulla produzione sperimentale di proliferazioni epiteliali atipiche nel padiglione auricolare del coniglio sono ormai state oggetto di controlli numerosi ed hanno anche ultimamente condotto a risultati nuovi ed interessanti, destinati forse a gettare qualche luce su problemi oscuri di meccanica dello sviluppo. *Fischer* dimostrò che l'iniezione di soluzioni oleose sature (olio di oliva) di rosso scarlatto, Sudan III, indofenolo fra la cute e la cartilagine auricolare del coniglio, era capace di provocare da parte dello strato epiteliale cutaneo una attiva proliferazione sotto forma di zaffi e cordoni che si addentrano nel connettivo, arrivando fino presso alla cartilagine, senza pur tuttavia acquistare mai un vero sviluppo destruente. L'olio collo Scharlachrot o col Sudan III avrebbe quindi un potere chemiotattico positivo sull'epitelio, il quale così prolifera e circonda i resti di olio e sostanza colorante giacenti nel connettivo; l'epitelio, dice *Fischer*, va dietro all'olio e si arresta e va incontro a corneificazione quando tutto l'olio col colore fu riassorbito. *Fischer* chiama quelle sostanze capaci di attrarre la proliferazione epiteliale col nome di *attraxine;* e non è alieno, data una certa somiglianza morfologica fra le sue proliferazioni atipiche sperimentali ed il cancro cutaneo, dal ritenere che con una

teoria delle attraxine potrebbe spiegarsi la genesi di molte neoplasie epiteliali anche maligne. *Fischer* ebbe risultati positivi sull'orecchio del coniglio, oltre che colle soluzioni oleose dei colori suddetti, in pochi casi anche con agar addizionato di carbone e fosfato di calcio. Gli epiteli che secondo *Fischer* reagiscono alle iniezioni di olio-Scharlachrot, o olio-Sudan III, sono essenzialmente quelli cutanei del padiglione auricolare del coniglio; gli epiteli di altri organi non risposero in grado apprezzabile. Solo questo Autore crede di avere ottenuto qualche risultato positivo sugli epiteli polmonari.

Le esperienze di *Fischer* furono successivamente riprese da numerosi ricercatori; e nelle linee fondamentali confermate. I primi sperimentatori lavorarono con quelle sostanze che rappresentavano per *Fischer* le attraxine per eccellenza per l'epitelio dell'orecchio del coniglio, il rosso scarlatto ed il Sudan III in soluzione nell'olio d'oliva: e se i risultati furono costanti, le interpretazioni si staccarono un po' dall'ordine di idee seguìto da *Fischer*. Alcuni, con *Wyss*, ammisero che l'olio agisse separando l'epitelio dal connettivo e turbando così la nutrizione dell'epitelio stesso, le cui cellule in tali condizioni di alterato ricambio assumerebbero proprietà *parassitarie* e prolifererebbero in modo esagerato, atipico, sconfinante. Questa teoria non ha gran valore, perchè dà troppa importanza all'olio come elemento meccanico, mentre già *Fischer* aveva veduto che le semplici iniezioni di olio hanno un effetto scarso o nullo e la parte principale nella produzione del fenomeno spetta al colore sciolto nell'olio. Del resto il dire che le cellule epiteliali, allontanate dal sottostante connettivo, si fanno *parassite* e proliferano, non è una spiegazione, ma una sostituzione di parole ad un concetto mancante. *Jores* trovò che anche gli endoteli dei linfatici cutanei proliferano attorno all'olio col colore, formando colonne cellulari e cellule giganti. Anch'egli è contrario ad ammettere una chemiotassi, una attrazione sugli epiteli o endoteli; e piuttosto tende a mettere in evidenza il fatto che gli epiteli hanno tendenza a rivestire superfici, quindi anche quelle determinate dall'iniezione di materiali estranei mal riassorbibili. Egli inoltre dimostra il fatto che non tutto l'epitelio cutaneo prolifera, ma che i centri di emissione degli zaffi atipici sono rappresentati dai follicoli pilo-

sebacei, mentre l'epitelio di rivestimento resta in genere indifferente. *Stahr* avrebbe ottenuto proliferazioni anche coll'iniezione sotto la cute dei topi; ed inclina a riconoscere un complesso di momenti determinanti, fra cui in primo luogo la particolare struttura anatomica della regione, che facilita più o meno le alterazioni nutritizie in seguito alle iniezioni di materiale eterogeneo.

Frattanto è interessante il ricordare che *Schreiber* e *Wengler* ottenevano fatti di mitosi negli elementi gangliari della retina coll'iniezione di olio al rosso scarlatto nella camera anteriore dell'occhio; e *Werner* otteneva aumento dei processi proliferativi nei tumori dei topi coll'iniezione in essi dello stesso materiale. *A. W. Meyer* riassume tutti questi fatti, trova che la proliferazione negli orecchi del coniglio si ha sia con le solite sostanze che con nerofumo, paraffina, olio + acido oleico, purchè l'iniezione sia assai abbondante e fatta sotto pressione e *dia luogo a formazione di bozza* sotto la cute. La legatura dei vasi dell'orecchio sarebbe un momento oltremodo favorevole, anzi anche la semplice legatura, purchè per processi infettivi o altro sia unita a fatti flogistici, potrebbe dare fatti proliferativi dell'epitelio. Sicchè si avrebbe a fare fondamentalmente con due momenti principali: flogosi cronica e disturbi circolatori. Infatti tutte le sostanze adoperate provocherebbero una flogosi cronica, di cui la proliferazione connettivale, che non manca mai attorno alla massa iniettata, sarebbe un'espressione; il fattore flogistico insieme a quello circolatorio e trofico darebbe la spinta alla proliferazione epiteliale. L'orecchio del coniglio sarebbe il campo più adatto per lo svolgersi di queste proliferazioni, appunto perchè in esso più facili sono le alterazioni nutritive, mentre altri epiteli sono meglio irrigati e nutriti. Si spiegherebbe così con questo rapporto fra alterazioni trofiche e flogistiche della parte e proliferazioni epiteliali, anche la necessità del formarsi della bozza all'atto dell'iniezione per avere risultato positivo.

Però non sono mancati gli AA. che hanno difeso la teoria chemiotattica: uno degli argomenti in favore di questa era che strofinando l'olio coi soliti colori sulla cute dell'orecchio, nè a *Fischer* nè ad altri, da noi per es. a *Fiorito*, era riuscito produrre proliferazioni epiteliali. Bensì doveva la sostanza attiva essere sempre introdotta nello strato sottoepiteliale e di lì agire sul connettivo. Veramente nell'uomo

lo *Schmieden* avrebbe trovato che le spennellature con olio al rosso scarlatto rappresentano un mezzo atto a favorire la ricuopritura di ferite granuleggianti, ed i suoi risultati avrebbero avuto conferma da vari AA. Ma si potrebbe sempre dire che la ferita permette alla soluzione oleosa la penetrazione assai in profondità, e quindi sarebbe sempre dagli strati sottoepiteliali o dalle zone granuleggianti non ancora epitelizzate che l'olio al rosso scarlatto agisce attirando l'epitelio. *Fiorito* conferma sostanzialmente i dati di *Fischer* per l'orecchio di coniglio. Egli poi avrebbe praticato delle iniezioni di olio al Sudan III nella parete gastrica di topi ed ottenuto delle proliferazioni epiteliali addentrantisi nel connettivo con trasformazione cheratojalinica delle cellule proliferate. Anche con iniezioni nello spessore della cornea del coniglio *Fiorito* ottenne proliferazioni atipiche; così pure con iniezioni nella parete vescicale del topo si avrebbero fatti proliferativi, però a carico dell'endotelio linfatico. Dall'insieme delle sue ricerche, la cui tecnica deve aver presentato difficoltà non lievi, *Fiorito* crede di poter concludere più a favore della teoria chemiotattica che non di quella irritativo-flogistica. Anch'egli non disconosce l'importanza della struttura anatomica dell'orecchio del coniglio, ove l'olio è più difficilmente riassorbito e più tempo ha di fungere da agente chemiotattico. *Stöber* prima da solo, poi in collaborazione con *Wacker*, ha portato un notevole contributo alla questione: egli ha trovato che una quantità di sostanze chimicamente non molto diverse dal Sudan III e dal rosso scarlatto danno del pari il *fenomeno di Fischer* nell'orecchio del coniglio: così l'amidoazotoluolo, l'amidoazobenzolo, la paratoluidina, gli amidocomposti della naftalina, la naftilamina, in soluzione oleosa, sono capaci di dare le classiche proliferazioni con compartecipazione dello strato germinale delle ghiandole sebacee. E non deve essere una pura coincidenza, se sostanze assai affini danno dei veri cancri (cancri della vescica in operai lavoranti coi colori di anilina).

In seguito *Stöber* e *Wacker* hanno usato come materiale di iniezione piridina 2 e 5 °/₀ in olio di oliva; indolina 5 °/₀ in grasso di coniglio; scatolo nello stesso solvente: tutte sostanze che si trovano anche nell'organismo come prodotti di disintegrazione dei proteici.

I risultati furono molto brillanti: specialmente colle iniezioni di indolo seguite dopo 2-3 giorni da scatolo si ebbero proliferazioni tanto abbondanti ed atipiche da essere quasi indistinguibili da un cancroide.

Così a poco a poco la lista delle sostanze capaci di dare la proliferazione atipica dell'epitelio dell'orecchio del coniglio si è assai allargata: ed è molto interessante la costatazione che si ha a fare con sostanze, di cui alcune già precedentemente in base a puri dati di osservazione empirica si erano messe in rapporto colla eziologia di speciali forme *professionali* di cancri: il cancro cutaneo dei lavoranti in paraffina, il cancro dello scroto degli spazzacammini, il cancro della vescica dei lavoranti in anilina.

Ultimamente *Wacker* e *Smincke* fanno una rivista completa di tutte le sostanze che nelle mani loro o di altri AA. sono state capaci di produrre le descritte proliferazioni epiteliali nel padiglione auricolare del coniglio. Risulta che si ha sempre a fare con sostanze *solubili nei lipoidi;* mentre non è sempre vera la proposizione inversa che le sostanze solubili nei lipoidi siano tutte capaci di dare il fenomeno di *Fischer:* infatti questo non si ottiene con olio di oliva puro, olio di ricino, olio di paraffina. Gli Autori in parola si sono domandati se forse queste sostanze, lipoidi o in essi solubili, agiscono producendo una *lipoidolisi* negli involucri lipoidali delle cellule ammessi ormai quasi da tutti in base ai principi di *Overton* e *Meyer*. Ma pare che una possibile funzione lipolitica o lipoidolitica non sia in causa, perchè estratti di linfociti, che, come si sa (*Bergell*) contengono un fermento lipasico, non danno affatto proliferazioni. Dunque le sostanze capaci di dare le proliferazioni sono modificatrici dei lipoidi cellulari, ma in modo probabilmente diverso da una lipoidolisi, e quale sia il loro meccanismo intimo di azione è prematuro il volerlo definire, solo dobbiamo accontentarci della pura e semplice constatazione che tutte queste sostanze sono lipoidosolubili.

Un fattore che spiega secondo *Wacker* e *Schmincke* perchè certe sostanze fra le lipoido-solubili siano più atte a dare proliferazioni è quello della *densità:* sostanze più dense restano più a lungo *in sito*, agiscono quindi di più. Un altro fattore importante è quello della *acidità*, trattandosi di grassi possiamo dire *rancidità*.

Il grasso di coniglio rancido dà anche da solo belle proliferazioni, perchè è denso e acido. Un miscuglio di acido β-ossibutirrico con acido eleidinico dà bei risultati. Interessante è la produzione di proliferazioni con estratto di tabacco in olio di oliva o grasso di coniglio, fatto che fa pensare alla patogenesi del così detto cancro dei fumatori.

Wacker e *Schmincke* infine nel loro accurato lavoro tengono ben distinte le proliferazioni dovute alle varie sostanze iniettate, agenti probabilmente per una modificazione chimico-fisica delle cellule e molto verosimilmente dei loro lipoidi, dalle proliferazioni osservabili in seguito a formazioni di cavità necrotiche o ascessuali, proliferazioni queste che non hanno nulla di speciale e sono l'espressione della ben nota tendenza degli epiteli a rivestire le superfici di cavità. È probabilmente con questa seconda specie di proliferazioni epiteliali che a mio parere ha avuto che fare *Meyer*, e come lui quelli AA., che ebbero proliferazioni in seguito a puri e semplici disturbi trofici e flogistici, infezioni, legature di vasi, ecc.

Recentissimamente e quasi contemporaneamente al lavoro di *Wacker* e *Schmincke*, sono comparsi due lavori sull'argomento, che si occupano in modo sostanziale ed esclusivo dell'influenza dei disturbi circolatori e trofici sulla formazione delle proliferazioni epiteliali: uno del *Greischer*, i cui risultati sono stati comunicati dal Prof. *Borst* anche all'ultimo Congresso di patologia di Torino, ed uno del *Gamna*. Il *Greischer* trovò che, se si praticano le iniezioni di olio-rosso scarlatto ed altre sostanze in modo al possibile eguale nei due orecchi di un coniglio, eppoi si inducono alterazioni di circolo da un lato, lasciando il circolo integro dall'altro, non si osservano differenze grandi fra i due lati. Le alterazioni di circolo erano prodotte o colla legatura di una carotide (anemia), o colla legatura delle vene alla radice del padiglione auricolare (iperemia passiva), o infine col taglio del simpatico cervicale (iperemia attiva). Se la proliferazione riesce dal lato normale, riesce anche dall'altro colla alterata circolazione. Solo si osserva in genere una proliferazione un pò più accentuata nell'orecchio con iperemia passiva in confronto al normale, un pò meno invece in quello con iperemia vasoparalitica attiva. Differenze queste che *Borst* ed i suoi allievi spiegano col fatto che là dove si ha stasi la sostanza iniet-

tata resta più a lungo in sito e più tempo ha di esercitare la sua azione, mentre nell'orecchio con accelerata circolazione la permanenza della massa iniettata è minore con minore spazio di tempo alla produzione dei consueti effetti. Se ne dovrebbe dedurre quindi che le alterazioni circolatorie hanno una importanza affatto secondaria: che quello che conta è sopratutto la *natura* della sostanza iniettata. Invece *Gamna* ebbe risultati assai diversi, talora opposti: negli orecchi vaso-paralitici per asportazione del ganglio simpatico cervicale superiore la proliferazione epiteliale mostra uno sviluppo più precoce, più rapido e più abbondante che dal lato sano: risultato perfettamente opposto a quelli di *Greischer*. *Gamna* ricorda come *Morpurgo* abbia trovato i processi di rigenerazione nell'orecchio di coniglio più rapidi in seguito al taglio del simpatico, e mette in rapporto con questa maggiore attività rigenerativa fisiologica anche il fatto da lui costatato del più rapido ed abbondante sviluppo del fenomeno di *Fischer*. *Gamna* concorda con *Greischer* nel trovare più rigoglioso sviluppo epiteliale nell'orecchio in preda ad edema meccanico. Trova poi che le pennellature di iodio danneggiano tale sviluppo, per le alterazioni recate al connettivo subepiteliale.

Gamma si trova infine in disaccordo con *Meyer*, quando costata la minor proliferazione negli orecchi infettati (con pneumo bacillo di *Friedländer*), mentre *Meyer* trovò talora nell' infezione un momento favorevole.

Questi i risultati delle ricerche più importanti e più complete sulla produzione del *fenomeno di Fischer*. In fondo, dopo la costatazione del processo fondamentale, dovuta a *Fischer*, che gli epiteli della cute dell' orecchio del coniglio proliferano in seguito all' iniezione sottocutanea di certe sostanze, tutte le ricerche ulteriori non hanno portato di contributi importanti che i seguenti: le sostanze ad azione proliferativa sono sempre solubili nei lipoidi o lipoidi esse stesse; esse sono numerose e fra esse sia sostanze del normale ricambio (indolo, scatolo), sia sostanze, per lo più a nucleo aromatico, ad esse affini ed affini ad altre che da tempo sono incolpate della produzione di neoplasie epiteliali da stimolo chimico; le condizioni di trofismo e circolazione della parte hanno qualche importanza, però non ancora valutabile in modo preciso, sopratutto però

espressa dal fatto che l' orecchio del coniglio è il luogo di elezione per queste esperienze, che mai hanno dato risultati così brillanti in altre regioni e su altri epiteli del coniglio stesso e di altri animali, nonostante i tentativi, non sempre del tutto infruttuosi, di molti Autori. L' epitelio dell' orecchio del coniglio dunque presenta una specie di attitudine specifica a proliferare in modo atipico sotto l'influenza di diverse sostanze; in esso abbiamo quasi direi una specie di *reagente* assai fine per saggiare se e fino a qual punto tali sostanze sono capaci di modificare la tensione nutritiva e la forza moltiplicativa di elementi epiteliali. Certo che noi non possiamo dai risultati nell' orecchio del coniglio dedurre in modo assoluto conseguenze da applicare ad altri epiteli: questi epiteli cutanei del coniglio devono essere in condizioni di speciale sensibilità a tal genere di stimoli proliferativi, forse non tanto per loro proprietà biologiche intrinseche, quanto piuttosto per la loro situazione rispetto ad altri tessuti, per condizioni meccaniche o trofiche speciali. Possono quindi esistere sostanze od agenti biologici qualsiasi, i quali, pur avendo azione proliferativa sugli epiteli in questione, non ne esercitano alcuna su altri epiteli di altri organi o animali; mentre d'altra parte altri epiteli possono benissimo essere sensibili a stimoli che lasciano indifferenti quelli del padiglione del coniglio. Proprietà speciali inerenti alla specie zoologica non possiamo invocarne, a spiegare la speciale reattività di questi epiteli all'azione delle varie sostanze surricordate: chè anzi, sebbene anche nel coniglio proliferazioni epiteliali di epiteli diversi dall' auricolare possano aversi per effetto di stimoli vari (proliferazione dei canalicoli biliari nella coccidiosi), d' altra parte le neoplasie in genere ed anche le epiteliali sono rarissime, più forse che in ogni altra delle specie zoologiche domestiche e di laboratorio, come tutti gli oncologi sanno.

Dunque da questa rapida rivista dei lavori principali sull' argomento possiamo dedurne che, volendo farsi un concetto dell' attitudine di una sostanza o agente biologico a provocare proliferazioni epiteliali, non è inopportuno il saggiarlo di fronte agli epiteli dell' orecchio del coniglio, senza pretendere di dedurre dall' esito dell'esperienza conseguenze troppo assolute. Certo un esito positivo, specialmente se si pensa agli esiti positivi così suggestivi con so-

stanze notoriamente in rapporto coll' eziologia di certi cancri, potrà sempre essere interessante ed istruttivo; un esito negativo dovremo registrarlo come un argomento che ci esorta alla prudenza nei giudizi ed alla ulteriore ricerca.

* * *

Io, partendo dai postulati delle teorie di *Sanfelice* sull' origine blastomicotica dei tumori, e anche allettato dai risultati recenti di *Galeotti* e *Pentimalli*, che hanno creduto di potere ammettere come dimostrata l' attitudine di prodotti blastomicetici a provocare proliferazioni atipiche di epiteli nel ratto e nel cane, ho voluto studiare quale influenza i blastomiceti vivi o morti o i loro veleni potessero esercitare sull' epitelio del padiglione del coniglio, sia da sè soli, sia in unione ad una delle sostanze che notoriamente hanno influenza proliferativa, per vedere se e come essi sostituissero o modificassero l' azione di questa.

Io ho lavorato col Sudan III in soluzione satura nell'olio di oliva, che ho inoculato nel solito modo (quantità da 1 a 3 cmc.) nel padiglione dell' orecchio del coniglio dalla parte interna. I prodotti blastomicetici da me usati sono stati rappresentati da vecchissime culture in brodo di fegato e brodo acido glucosato di *Saccharomices neoformans,* preparate già da circa 2 anni dal collega *Franchetti* all'epoca dei suoi completi ed esaurienti lavori sull'origine infettiva dei tumori; culture, che erano chiuse alla lampada e conservate all'oscuro, nelle condizioni più adatte quindi per contenere le tossine specifiche aventi importanza per la genesi dei tumori, secondo le idee del *Sanfelice.* Queste culture erano certamente morte, dopo un sì lungo periodo di conservazione; però è bene notare che le cellule dei blastomiceti erano ancora assai ben conservate, una dissoluzione di esse non pareva aver avuto luogo molto abbondantemente.

Io stesso ho poi preparato delle culture fresche di *S. neoformans* su barbabietole, nel modo indicato da *Galeotti* e *Pentimalli.* Sulle barbabietole, tagliate a fette e sterilizzate, il *S. neoformans* si sviluppa benissimo, formando una patina bianca abbondante, che poi arrossa, e approfondendo la sua vegetazione anche nella massa delle fette di

barbabietole, come risulta dall'esame microscopico di tali barbabietole. Chi credesse di raschiare la patina eppoi inoculare pezzetti di barbabietola in animali nel concetto di inoculare così le sole tossine solubili e diffusibili, incorrerebbe in un errore grave, venendo invece ad inoculare insieme anche blastomiceti, che anzi si mantengono vivi per un tempo che io non ho ben determinato, ma che deve essere assai lungo, di parecchi mesi. Anche di queste culture vive su barbabietole mi sono servito per le esperienze che ora esporrò nel modo più succinto possibile.

Non riporto per esteso tutti i protocolli. Esporrò solo fra i fatti osservati i più interessanti.

In 4 conigli si usarono gli 8 orecchi per provocarvi le proliferazioni epiteliali coll'olio al Sudan III, collo scopo di riprodurre il fenomeno fondamentale e di farsene un' idea personale. Posso confermare che, come *Jores* ammette, le proliferazioni più estese partono sempre dai follicoli pilo-sebacei, e tendono à dirigersi verso le raccolte maggiori di olio nel connettivo. Interessante è che in un orecchio di un coniglio si vedono delle belle proliferazioni anche dalla parte opposta a quella ove fu inoculato l'olio al Sudan III, come se lo stimolo chemiotattico si fosse trasmesso attraverso alla cartilagine, che non sembra sensibilmente lesa, nonostante le numerose sezioni esaminate. Questo reperto deporrebbe per un' azione a distanza, anche su epiteli assai lontani. Le proliferazioni non sono mai molto durevoli: già dopo una diecina di giorni la corneificazione in seno agli zaffi epiteliali è molto abbondante, dopo 20-30 sembra arrestarsi ogni proliferazione. Io posso in generale asserire che un vero parallelismo non esiste fra le modificazioni reattive, flogistiche del connettivo attorno alla massa iniettata ed i fatti proliferativi nell' epitelio, come *Meyer* ed altri hanno voluto ammettere. La reazione connettivale sembra presentare oscillazioni quantitative notevoli da caso a caso, da esperienza ad esperienza, come le presenta l' intensità della proliferazione epiteliale, anche quando si è cercato di fare le iniezioni in modo al possibile uniforme. Ma queste oscillazioni non sono sempre parallele, potendosi avere scarsa proliferazione epiteliale con abbondante proliferazione reattiva del connettivo e viceversa. Noto espressamente che negli orecchi, cui iniettai solo olio al Sudan III, in dosi da 1 a 3 cmc. circa, mai ho

avuto fatti suppurativi o necrotici. Si aveva la formazione di una modica bozza, necessaria pel buon esito dell' esperienza, secondo *Meyer*, l' orecchio restava caldo e penzolante per 2 o 3 giorni, poi poco a poco riprendeva l' aspetto ed il portamento normale, tranne l' ispessimento od un vero nodulo al punto di iniezione. La reazione connettivale è una vera reazione fibroblastica, che non ha nulla di specifico, ma che presenta da caso a caso, oltre le suddette variazioni quantitative, anche delle diversità qualitative: in certi casi si ha abbondante formazione di cellule giganti, plurinucleate, ad abbondante protoplasma, talora unite a nodi di 3 o 4; in altri gli elementi fibroblastici sono soli, mancando le cellule giganti. Il caso più spiccato di reazione a cellule giganti lo vidi in un orecchio, iniettato 22 giorni avanti l' esame istologico con modica quantità di olio (1,5), e solo 4 giorni avanti a questo (quindi 18 giorni dopo l' iniezione d' olio) con brodocultura vecchia di blastomiceti: le cellule giganti avevano caratteri tali (nuclei multipli, degenerati in parte, protoplasma abbondante) da fare escludere ogni rapporto genetico coll' iniezione della cultura, avvenuta solo 4 giorni prima, da fare piuttosto ritenere che esse fossero dovute all' iniezione dell' olio.

Le variazioni nella reazione flogistica del connettivo e nella reazione proliferativa dell' epitelio sono dovute certamente, almeno in parte, a proprietà individuali, che hanno importanza qui, come in tutti i processi biologici. Per es. ho avuto un coniglio (n. 10 dei protocolli) in cui la reazione è stata quasi nulla per quanto riguarda l' epitelio dei due orecchi, nonostante una iniezione ben riescita in ambedue di olio; e solo si è avuta una modica proliferazione connettivale attorno all' olio, che pure era stato iniettato colla tecnica consueta ed in quantità non inferiore alla solita.

Venendo ora alle esperienze di trattamento misto con olio al Sudan III e blastomiceti o di trattamento con soli blastomiceti, dirò come fosse mio scopo di vedere non solo se questi germi o loro prodotti avessero di per sè una azione sull' epitelio auricolare, ma anche di vedere come essi potessero influenzare le proliferazioni già avviate, vale a dire epiteli, che già per altra causa si trovano in stato di squilibrio rispetto agli altri tessuti. Infatti potrebbe darsi che le tossine del *Sanfelice* agissero su epiteli in stato per così dire di

predisposizione alla proliferazione [1]; supposizione questa, che ha ispirato anche quelli AA., che come *Alessandri* e *Zapelloni* hanno inoculato ai ratti poltiglie di embrioni insieme a prodotti blastomicetici. Anche le cellule di embrioni sono elementi colti nell' atto di proliferare, a grande energia moltiplicativa: ed io stesso ho in corso esperienze sul tipo di quelle di *Alessandri* e *Zapelloni*, destinate a risolvere la questione di una eventuale azione delle presunte tossine su cellule in stato di predisposizione o maggior sensibilità agli influssi blastici, neoformativi.

Sanfelice, e come lui *Galeotti* e *Pentimalli*, trovano che le proliferazioni o le metaplasie hanno luogo in punti lontani a quello dell'iniezione dei prodotti blastomicetici, per es. nello stomaco o nel duodeno, in seguito a iniezione endoperitoneale: potrebbe ciò essere espressione della necessità di una speciale predisposizione, che potrebbe anche esser data da stimoli flogistici, meccanici, chimici. Io ho creduto di predisporre all'azione di eventuali tossine o sostanze comunque *blastiche* dei blastomiceti gli epiteli dell'orecchio del coniglio colle iniezioni di olio al Sudan III; e di vedere se da parte di tali sostanze si abbia un rinforzo della già assai intensa azione del Sudan III in olio.

I conigli adoperati sono stati 11, e in quasi tutti ho utilizzato ambedue gli orecchi. Le esperienze di inoculazione mista erano in generale fatte inoculando circa a metà altezza del padiglione di un orecchio il colore e dopo un certo tempo (da 4 giorni a 1 mese) la brodocultura di blastomiceti invecchiata e morta (in un caso filtrata) un poco più distalmente rispetto all' iniezione del colore; l'altro orecchio serviva per controllo e riceveva la sola iniezione di colore: così furono trattati 6 conigli. Un coniglio (n. 7 dei protocolli) ebbe nel padiglione dell'orecchio sinistro, l'iniezione del colore; dopo 18 giorni l'iniezione della brodocultura nei 2 padiglioni; e dopo altri 17 giorni fu ucciso e gli orecchi esaminati. Altri 3 ricevettero delle inoculazioni di pezzetti di barbabietola, su cui si erano sviluppati i blastomiceti nel modo suddetto: tali pezzetti contenevano blastomiceti vivi; la inoculazione era fatta colla cannula di *Wasyliewsky*, che si usa per i fram-

[1] *Sanfelice* nel suo libro, pubblicato ultimamente «Eziologia e cura dei tumori maligni» insiste molto sul concetto di *predisposizione*.

menti di tumore. Tutti e tre questi conigli furono inoculati nei 2 orecchi, però a tempi diversi, per avere gli effetti sul tessuto a diversi stadi al momento dell' uccisione dell'animale. Su un altro coniglio poi ho inoculato barbabietola sterile per confronto (sui due padiglioni).

Sicchè io avevo diverse combinazioni: azione delle vecchie brodoculture morte, integre o (in un coniglio) filtrate; combinata coll'azione del colore (6 animali) o sola (orecchio destro di un coniglio, n. 7 del protocollo); azione di blastomiceti vivi delle culture su barbabietole, da soli (3 animali); azione delle barbabietole da sole (un animale).

I prodotti blastomicetici non pare abbiano per niente contribuito a modificare, nè in più nè in meno, le proliferazioni da olio-Sudan III. In generale l'effetto principale, tutte le volte che si sono inoculate culture vive o morte, è stata la formazione di una piccola cavità ascessuale, nella quale si scorgono ammassi leucocitari per lo più molto degenerati, e qualche volta residui di cellule di *Saccharomices*, frammentate e scolorate; attorno attorno una zona di proliferazione reattiva del connettivo. Dunque i blastomiceti, tanto vivi che morti, hanno essenzialmente avuto un'azione locale flogogena di modica entità; ma, tranne che in un caso, l'epitelio non si è risentito. Questo caso è quello di un coniglio che porta il n. di protollo 2, che ebbe nell'orecchio destro una iniezione con olio-Sudan III e dopo 18 giorni una con cultura vecchia in brodo; a sinistra, una iniezione di olio al Sudan soltanto, però 17 giorni più tardi che la iniezione di olio a destra; l'esame istologico fu fatto 2 mesi dopo. Nei due orecchi si aveva un abbondante sviluppo epiteliale, che all'epoca dell'esame aveva condotto ad abbondante corneificazione, in modo che si avevano come grandi cisti, tappezzate da epitelio piatto e ripiene di detriti cornei. A destra però lo sviluppo delle cisti in parola era più accentuato; sopratutto dominava una vasta ciste, la più ampia, che era ripiena oltre e più che di masse cornee di detrito leucocitario e leucociti alterati, e la cui parete era al solito rivestita di epitelio piatto. Questa vasta cavità cistica era certo il prodotto dell'azione dei blastomiceti morti: era il solito ascessolino consueto a formarsi, già visto

in altri orecchi; tranne che qui la sua cavità era stata rivestita da epitelio proliferato. Deve in questa esperienza ammettersi una speciale azione da parte dei blastomiceti o loro prodotti, che si è sommata a quella dell'olio-Sudan III? A me non pare. Infatti la proliferazione epiteliale più accentuata dal lato destro potrebbe interpretarsi un pò colla maggiore sua durata: l' iniezione di colore fu fatta ivi 17 giorni prima che a sinistra. Però la differenza è maggiore che non dovrebbe comportare tale differenza di tempo; la medesima differenza avrebbe grande importanza se l'esame istologico fosse stato precoce; ma una volta che questo fu intrapreso dopo 2 mesi e 17 giorni dall'iniezione a destra e 2 mesi da quella sinistra, ad un epoca cioè in cui i processi progressivi dell'epitelio dovevano essersi arrestati dai due lati, la differenza potrebbe tradirsi non tanto con maggior sviluppo, nell' orecchio prima iniettato, delle perle e degli zaffi epiteliali, quanto con maggior corneificazione, maggiori fatti regressivi di essi. Io credo che i blastomiceti abbiano avuto una parte, ma non perchè abbiano una azione proliferativa sugli epiteli come il Sudan III, bensì in quanto hanno prodotto fatti suppurativi e necrotici, con formazione di raccolta di pus. Ricordo quanto dicono *Wacker* e *Schmincke*: si devono considerare a parte le proliferazioni dovute a sostanze agenti in modo speciale sugli epiteli e quelle dovute semplicemente alla formazione di ascessi e cavità necrotiche, che gli epiteli tendono naturalmente a rivestire, come tendono a rivestire le superfici libere in genere. Se negli orecchi dei miei conigli non ho avuto sempre tale non specifica, banale proliferazione, in seguito alla formazione di cavità ascessuali da blastomiceti vivi o morti, ciò si deve forse al fatto che non sempre l' iniezione delle culture dislocò lembi di epitelio, o penetrò entro cavità cistiche già formate (da precedente iniezione di colore), come deve essere successo in questo caso; poichè è logico ammettere che la tendenza suddetta degli epiteli a cuoprire le superfici libere del connettivo si estrinsechi più facilmente, se non esclusivamente, quando la superficie libera nuova si formi in contatto con superfici già coperte da epitelio.

In tutti gli altri casi dunque l'epitelio non si è risentito affatto delle culture di blastomiceti, anzi in un coniglio (n. 9 dei protocolli) parrebbe quasi che si fosse avuto un minor sviluppo di

perle epiteliali dal lato a trattamento misto, che da quello a solo colore. Ma forse sono in giuoco piccole diversità nella tecnica, nella pressione e quantità della soluzione oleosa iniettata, ecc.

In un coniglio (n. 4 dei protocolli) l'iniezione (a sinistra) di olio-Sudan III dette delle magnifiche proliferazioni, si formò anzi un nodulo rilevato, che, escisso dopo 10 giorni, presentava un aspetto simile ad un vero cancroide. L'iniezione della brodocultura di blastomiceti non ritardò affatto la consueta corneificazione e regressione, e l'apparenza di cancroide dopo un altro mese era completamente scomparsa.

Anche i blastomiceti soli (culture vive su barbabietola) non hanno dato che fatti reattivi del connettivo: si osserva anche dopo 2-3 settimane il residuo del pezzetto di barbabietola, con molto mal riconoscibili detriti di blastomiceti, tanto mal riconoscibili che non ne asserirei con certezza la natura; attorno l'infiltrazione leucocitaria densa; poi una reazione fibroblastica intensa del connettivo. Il filtrato di culture morte vecchie in brodo glicosato acido usato per un solo orecchio non ha dato quasi nessun fatto reattivo nè suppurativo. La limitata azione piogena pare dunque esser legata al corpo cellulare del *Sacchcromyces*, probabilmente alle sue proteine o ai suoi nucleoproteidi.

La sola barbabietola non ha dato che fatti reattivi insignificanti, lievissimi del connettivo.

La mia attenzione è stata diretta, nell'esame dei preparati istologici, non solo al comportamento dell' epitelio e del connettivo sottostante ma anche a quello della cartilagine, sopratutto dopo la lettura del lavoro del *Centanni*, il quale mi ha preceduto nell'esperienze di inoculazione di prodotti blastomicotici nel padiglione auricolare del coniglio. Questo A. inoculava però solo lipoidi estratti dai blastomiceti, e si occupa in modo esclusivo dell'azione sulla cartilagine, che egli trova essere, per esprimersi colla sua terminologia, *blastica negativa*, vale a dire consistente in fondo in fatti di atrofia e degenerazione. Il *Centanni* trova che invece estratti lipoidali di sarcomi o pezzi di organi a secrezione interna (testicolo) o fibrina hanno un' azione *blastica positiva*, eccitatrice di proliferazione; e considera l'effetto positivo o negativo come due

fasi di un medesimo processo reversibile, processo che rientrerebbe nella categoria dei catalitici. Quindi egli dà valore eguale tanto all'effetto neoformante dei lipoidi neoplastici come a quello atrofizzante dei lipoidi blastomicetici; ed anzi adduce quest' ultimo in appoggio dell'azione proliferativa dei blastomiceti sui tessuti.

Le idee, certo geniali, del *Centanni* non sono ancora appoggiate su un tale numero di fatti positivi da autorizzarci ad un giudizio sicuro, come l'A. stesso riconosce molto opportunamente: la dottrina delle *blastine* presenta, dice il *Centanni*, molte lacune e molteplici incertezze. Per ora a me sembra prematuro il volere dedurre da un effetto atrofizzante degli estratti blastomicetici sulla cartilagine che i blastomiceti possano avere proprio un' azione opposta, proliferativa, blastica positiva; ed interpreterei piuttosto, come anche *Centanni* pare non possa rifiutarsi di fare, « il manifestarsi di un' atrofia con molteplici forme di offesa cellulare ». Per esaurire l'argomento dell'azione sulla cartilagine, dirò che io non ho mai rilevato nulla di speciale, tranne in qualche caso la formazione di focolai di degenerazione evidente, simili a quelli descritti da *Centanni*, accompagnata da cicatrizzazione, specie nei casi ove per l'inoculazione di cellule blastomicetiche vive o morte si erano formate cavità ascessuali o reazioni flogistiche un pò intense del connettivo sottoepiteliale e pericondrale. Non escluderei che in qualche caso si sia avuto a fare con conseguenze di lesioni traumatiche della cartilagine, dovute all'ago con cui si faceva l'inoculazione. Anche a qualche ispessimento lieve della cartilagine non ho creduto di dare importanza, trattandosi di orecchi assai traumatizzati per due o tre iniezioni, ove quindi irritazioni e lesioni varie della cartilagine e del pericondrio non sono nulla di strano.

Io quindi, in base a queste esperienze, concluderei che colla tecnica usata i blastomiceti, sia in culture vecchissime e verosimilmente ricche delle presunte tossine del *Sanfelice*, sia viventi, non hanno saputo produrre proliferazioni nell' epitelio del padiglione auricolare del coniglio, nè in alcun modo influenzare quelle dovute alla iniezione di olio-Sudan III (fenomeno di *Fischer*); i blastomiceti dunque non conterrebbero nè produrrebbero sostanze capaci di modificare l' equilibrio fra connettivo ed epitelio nel padiglione auricolare del coniglio, ed azione cioè simile a quella di

molti corpi lipoidi o lipoido-solubili, studiati già da molti Autori e messi anche in rapporto colla eziologia di certe neoplasie.

Questo fatto, della mancata azione dei blastomiceti sull'epitelio dell'orecchio del coniglio, non ha naturalmente che il valore dei fatti negativi; e può solo spronarci ad ulteriori ricerche. Io ho cercato anche di produrre *predisposizione alla proliferazione* nei tessuti di topi e ratti (sottoposti a trattamento continuato con prodotti blastomicetici), mediante iniezioni ripetute di olio-Sudan III nel peritoneo e sottocute; ma i risultati sono stati del pari negativi fino ad oggi; e saranno, nel caso che essi presentassero qualche interesse, fatti oggetto di una pubblicazione futura.

Letteratura.

Alessandri e Zapelloni, Tumori, anno I, fasc. III, 1911.

Centanni, Pathologica, n. 70, 1911.

Fiorito, Archivio per le scienze mediche, n. 19, 1909.

Fischer, Verh. d. deutschen pathol. Gesellschaft, pag. 20, 1906.

— Münchn. med. Woch., n. 42, 1906.

Galeotti e Pentimalli, Centralbl. f. Bakt. I Abt. Orig., Bd. 56, H. 3, 1910.

Gamna, Pathologica, n. 70, 1911.

Greischer, Zeitschr. f. Krebsforsch., Bd. 11, H. 1, 1911.

Jores, Münchn. med. Woch., 1907.

Meyer, Ziegler's Beiträge, Bd. 46, H. 3, 1909.

Sanfelice, L'eziologia e la cura dei tumori maligni. Un. tip. edit. torinese, 1911.

Schmieden, Centralbl. f. Chir., 1908.

Schreiber, u. Wengler, Centralbl. f. allg. Path., Bd. 19, n. 13, 1908.

Stahr, Münchn. med. Woch., 1907.

Stoeber u. Wacker, Münchn. med. Woch., n. 18, 1910.

Wacker u. Schmincke, Münchn. med. Woch., n. 30-31, 1911.

Werner, Münchn. med. Woch., pag. 2267, 1908.

Wyss, Münchn. med. Woch., 1907.